# Beiträge zur Kenntnis des Verhaltens von Kohlenoxydblut unter gewissen Umständen.

Inaugural-Dissertation

ACAD. LUGD. BAT BIBL.

zur

**Erlangung der Doktorwürde**

der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt

von

**Kurt Gestewitz**
aus **Falkenberg.**

**Rostock.**
Rats- und Universitäts-Buchdruckerei von Adlers Erben, G. m. b. H.
1912.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät zu Rostock.

Referent: Professor Dr. Kobert.

Dass Kohlenoxydhämoglobin in reiner Form, ja in Krystallen darstellbar ist, ist eine längst bekannte Thatsache. Ebensowenig ist es zweifelhaft, dass sich durch Centrifugiren aus Kohlenoxydblut die das CO enthaltenden rothen Blutkörperchen vom Serum ohne Verlust ihres CO-Gehaltes abtrennen lassen. Ob aber aus verdünntem Blute oder gar aus aufgelösten Blutkörperchen sich durch fällende Mittel das Kohlenoxyd mitfällen lässt, ist trotz grosser praktischer und theoretischer Bedeutung dieser Frage, recht ungenügend erforscht. Das Nachstehende soll zur Klärung dieser Frage Einiges beitragen.

## I. Theil, betreffend Versuche mit Kohlenoxydblut, dessen rothe Blutkörperchen nicht aufgelöst sind.

Lassen sich mit Kohlenoxyd beladene rothe Blutkörperchen aus mit physiologischer Kochsalzlösung stark verdünntem Blute unter Verlust ihrer Form niederschlagen, ohne dabei ihres CO-Gehaltes verlustig zu gehen?

Diese Frage ist vom theoretischen Standpunkte aus nicht uninteressant. Unseres Wissens ist sie noch niemals einer experimentellen Prüfung unterzogen worden; deshalb schlug mir Prof. Kobert vor, darüber eigene Versuche anzustellen. Zum Zweck des Niederschlagens der Blutkörperchen zog ich die Gruppe der vegetabilischen Hämagglutinine heran.

Unter dieser von Kobert[1]) und seinen Schülern geschaffenen Gruppe von Stoffen versteht man Pflanzensubstanzen, welche in physikalischer Hinsicht ein eiweissähnliches oder enzymähnliches Verhalten zeigen, d. h. beim Ausfällen von Eiweissen leicht mit niedergerissen werden. Ebenso werden sie beim Erzeugen unorganischer voluminöser Niederschläge durch Adsorption ihren Lösungen entzogen. Ihren physiologischen Wirkungen nach müssen sie mindestens in zwei Untergruppen geschieden werden nämlich in giftige[2]) und ungiftige. Da ich im Nachstehenden je einen

1) R. Kobert, Lehrbuch der Intoxicationen. 2. Aufl. Bd. 2. S. 698.

2) Ueber die giftigen Glieder unserer Gruppe sei zur Orientirung auch über die Ansichten anderer Autoren auf die kritische Zusammenstellung von M. Jacoby im Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung (Bd. 1, S. 311, Jena 1907) verwiesen.

Repräsentanten beider Gruppen benutzt habe, möge es mir erlaubt sein, vorher kurz über beide eine Orientirung zu geben.

Wie der Name schon sagt, haben unsere Substanzen die Eigenschaft, recht verschiedenartige isolirte Zellen, vornehmlich aber Blutkörperchen, zur Agglutination zu bringen. Der erste Nachweis, dass es Substanzen mit einer derartigen Wirkung giebt, ist von Kobert und H. Stillmark[1]) im Jahre 1887 erbracht worden. Als erstes pflanzliches Agglutininin führten sie damals das Ricin, das sie aus dem Ricinussamen darstellten, in die Wissenschaft und den Handel ein. Das Ricin der Firma E. Merck wird noch heute nach der damals für diese Firma von Kobert ausgearbeiteten Methode gewonnen. Weiter wurden dann noch in Dorpat von H. Hellin das Abrin und von Elfstrand das Crotin untersucht. In Rostock liess Kobert von Lau das Robin näher prüfen. Neuerdings wurde in Wien von Landsteiner und Raubitschek, von v. Eisler und von v. Portheim nachgewiesen, dass auch in Bohnen, Erbsen, Linsen und Wicken Agglutinine enthalten seien, die jedoch ungiftig sind. Nach dem Vorschlag von Kobert und Wienhaus, der zahlreiche Papilionaceen auf Agglutinine untersuchte, fasst man alle ungiftigen agglutinirenden pflanzlichen Substanzen unter dem Namen der Phasine zusammen, welche Bezeichnung von dem am genauesten studirten Gliede dieser Gruppe, dem Agglutinin der Phaseolusarten, hergenommen ist.

Durch eine Reihe eigener Versuche habe ich mich zunächst von der starken Agglutinationskraft sowohl giftiger als ungiftiger Agglutinine an verdünntem Blute verschiedener Thierarten überzeugt.

Meine Aufgabe bestand alsdann darin, zu erforschen, ob bei Zusatz von solchen pflanzlichen Agglutininen zu Kohlenoxydblutlösungen das Kohlenoxyd am Hämoglobin gebunden bleibt und mit ausgefällt wird.

Selbstverständlich war es keineswegs, dass der CO-Gehalt der Blutkörperchen beim Agglutinationsprozess erhalten bleibt. Unter dem Mikroskop sieht man leicht, dass im Moment der Agglutination schwere Formveränderungen vor sich gehen, welche die Blutkörperchen völlig unkenntlich machen. Auch chemisch gehen analoge Umwandlungen dabei vor sich, welche sehr leicht mit einer Austreibung des Kohlenoxyds verbunden sein könnten.

Um von meinem Verfahren bei den Versuchen eine Vorstellung zu geben, will ich einige Versuchsprotokolle hier zum Abdruck bringen.

---

1) H. Stillmark, Ueber Ricin. Arbeiten d. pharmakol. Inst. zu Dorpat. Bd. 3. Stuttgart 1889. — K. Hellin, Der giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut. Diss. Dorpat 1891. — Elfstrand, Ueber blutkörperchenagglutinirende Eiweisse. Görbersdorfer Veröffentlichungen, herausgegeben v. R. Kobert. Bd. 1. Stuttgart 1898. S. 11. — Wienhaus, Zur Biochemie des Phasins. Dissertation. Rostock 1909. Biochem. Zeitschr. Jahrgang 1909. — Assmann, Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Agglutinine. Dissertatioa Rostock 1911. Pflüger's Archiv. Bd. 137. 1911.

## 1. Eigene Versuche mit Kaninchenblut und Ricin.

Zu 8, zu 18 und zu 25 ccm eines 10 proc. Gemisches frischen Kaninchenblutes mit physiologischer NaCl-Lösung werden je 2 ccm des klaren Filtrates einer 5 proc. frischen Ricinussamenemulsion gesetzt. In gleicher Weise werden je 2 ccm Filtrat dieser Emulsion zu entsprechenden Portionen des Blutgemisches gesetzt, nachdem diese vorher mit CO-Gas vergiftet ist.

Schon nach ca. 15 Minuten tritt in allen Gläsern Agglutination teilweise ein. Nach etwa zwölfstündigem Stehen ist eine völlige Agglutination eingetreten, d. h. es hat sich ein dicker roter Bodensatz und eine wasserhelle darüberstehende Flüssigkeitsschicht gebildet. Letztere lässt sich in allen sechs Gläschen leicht abgiessen, während der Bodensatz ein zusammenhängendes Ganzes bildet.

Gleiche Teile der frischen, noch feuchten Niederschläge aller Gläser werden nun in gleichen Mengen sauerstofffreiem schwefelammonhaltigem Wasser[1]) klar gelöst und nach Zusatz von noch je 2 Tropfen unverdünnten Schwefelammons mit flüssigem Paraffin überschichtet. Unterschieden sich die beiden Blutbreiarten, nämlich der CO-haltige und der normale Brei, an und für sich und besonders nach ihrer Lösung in alkalischem Wasser schon äusserlich durch ihre verschiedene Färbung, so tritt nach dem Zusatz von Schwefelammon und dem Abschlusse der Luft durch darübergeschichtetes Paraffin stets eine ganz deutliche Verschiedenheit im spektroskopischen Bilde ein, denn schon nach knapp 10 Minuten langem Stehen ist in den Gläsern mit CO-freien Blutlösungen deutliche Reduction eingetreten, während die CO-haltigen Lösungen noch unverändert ihr zweistreifiges Spectrum haben und auch tagelang bewahren.

## 2. Eigene Versuche mit Meerschweinchenblut sowie mit Hammelblut und Phasin.

Zu den folgenden Agglutinationsversuchen wurde zunächst eine Phasinlösung benutzt, die folgender Weise hergestellt wurde:

5 g des käuflichen Phasins, das nach den Angaben von Prof. Kobert von der Firma Merck aus Samen von Phaseolus vulgaris hergestellt wurde, werden allmählich in der Reibschale mit 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung zu einer milchigweissen Flüssigkeit verrieben. Danach wird die Lösung längere Zeit kräftig geschüttelt, einige Stunden in ein Wasserbad von 38° gestellt und dann filtrirt.

### Versuch I.

Zu 9 ccm einer 2,5 proc. Meerschweinchenblutkochsalzlösung wird 1 ccm Phasinlösung gesetzt. Es zeigt sich sehr bald Agglutination.

Das Gleiche geschieht bei einer gleichen Menge der Blutkochsalzmischung, die mit CO-Gas vergiftet ist.

Der weitere Verlauf des Versuches ist wie bei Versuch II.

### Versuch II.

Zu 9, zu 19 und zu 49 ccm eines 10 proc. Gemisches frischen Hammelblutes mit physiologischer Kochsalzlösung werden je 1 ccm Phasinlösung gesetzt. In gleicher Weise werden gleiche Mengen derselben Blutlösung behandelt, nachdem diese vorher mit CO vergiftet ist. Nach 12 Stunden ist in allen Röhrchen Agglutination eingetreten.

---

1) Der Gehalt dieses Wassers an Schwefelammon kann ein minimaler sein.

Die agglutinirten Blutkörperchen senken sich als dicker, schöner rother Niederschlag, über dem Agglutinat steht eine wasserklare Flüssigkeit.

Der Niederschlag wird filtrirt, und von dem frischen, noch feuchten Niederschlage wird nun je eine kleine Portion in $S(NH_4)_2$-haltigem Wasser leicht mit schöner rother Farbe gelöst. Zu gleichen Mengen der Lösungen, die alle gleiche Concentration haben, werden nun je 2 Tropfen unverdünnten Schwefelammons hinzugesetzt und die Lösungen mit flüssigem Paraffin überschichtet. Schon nach kurzer Zeit werden die CO-freien Lösungen, die vorher ein zweistreifiges Spectrum zwischen D und E aufwiesen, reducirt, während die CO-haltigen Lösungen ihr altes, zweistreifiges Spectrum unverändert zeigen und es auch nach sechstägigem Stehen und am folgenden Tage beibehalten.

Von dem durch Agglutination mittels Phasinlösung gewonnenen Niederschlägen werden gleiche Portionen an der Luft getrocknet, zu einem feinen Pulver verrieben und dieses in schwefelammonhaltigem Wasser gelöst. Es tritt in beiden Blutartlösungen, der normalen und der CO-haltigen, glatte Lösung ein. Beide zeigen ein zweistreifiges Spectrum zwischen D und E; nur in der Farbe unterscheiden sich beide. Während das normale Blutpulver eine gelblichrothe Lösung ergiebt, löst sich das CO-haltige Pulver mit einer intensiv rothen Farbe, die, gegenüber der normalen Lösung, einen Stich in's Bläuliche aufweist.

Zu gleichen Portionen der Blutpulverlösungen, die etwa gleiche Concentration haben, werden wieder je einige Tropfen Schwefelammons gesetzt und die Lösungen mit Paraffin überschichtet. Auch hier tritt bei den normalen Lösungen sehr schnell Reduction ein, während die mit CO-Gas vergifteten unverändert ein zweistreifiges Spectrum tagelang beibehalten.

## Ergebniss.

Man kann aus einer Mischung von normalem defibrinirtem Blut verschiedener Thierarten mit physiologischer Kochsalzlösung die Blutkörperchen mittels einer Ricin- oder einer Phasinlösung agglutiniren, so dass sie als dicker Niederschlag ausfallen. Den Niederschlag kann man frisch in schwefelammonhaltigem Wasser lösen; beim Schütteln mit Luft nimmt diese Lösung eine schöne rothe Farbe an und zeigt ein zweistreifiges Spectrum zwischen D und E, welches mit dem des Oxyhämoglobin identisch ist.

Auch Blut, das mit CO vergiftet ist, lässt sich genau so behandeln wie CO-freies Blut. Auch hier entsteht ein rother Niederschlag, der in schwefelammonhaltigem Wasser mit rother Farbe löslich ist und ein zweistreifiges Spectrum selbst ohne Schütteln zeigt, und zwar das des CO-Hämoglobins. Trotz des Zusatzes von starkwirkenden Reductionsmitteln behält es Tagelang unverändert seine beiden Streifen zwischen D und E im Spectrum bei, während die Lösung des aus normaler Blutkörperchenlösung hergestellten Niederschlages schon nach wenigen Minuten reducirt wird.

Das CO wird also mittels der Agglutination mit niedergeschlagen und bleibt an Hämoglobin gebunden. Noch merkwürdiger ist, dass dieser Niederschlag ohne Zersetzung zu Pulver verrieben werden kann, nachdem er in dünner Schicht auf Glas bei normaler Zimmertemperatur getrocknet worden ist. Er ist dann natürlich noch nicht völlig wasserfrei. Er lässt sich als Pulver Tagelang aufheben und jeder Zeit wieder mit rother Farbe

lösen. Der Niederschlag des normalen Blutes in analoger Weise behandelt und wieder gelöst wird nach dem Schütteln der Lösung gelblichroth, der des CO-haltigen Blutes aber ist und bleibt rein roth, ein Farbenunterschied, der sehr deutlich ist. In der Lösung des CO-Blutpulvers lässt sich Tagelang das CO spektroskopisch nachweisen.

Das Niederschlagen der mit CO beladenen Blutkörperchen gelingt auch bei 100facher Verdünnung des Blutes mit physiologischer Kochsalzlösung noch sehr gut.

## II. Theil, betreffend Versuche an Kohlenoxydblut, dessen Blutkörperchen durch Wasserzusatz aufgelöst worden sind.

Lässt sich aus verdünnten Lösungen von CO-Blut das CO mit dem Blutfarbstoff durch geeignete Fällungsmittel niederschlagen, von der Flüssigkeit trennen und im Niederschlag nachweisen?

Die Frage dieses Kapitels hat ein erhebliches practisches Interesse, denn es ist denkbar, dass in ein Gefäss mit Wasser eine geringe Menge von CO-Blut gegossen ist, dessen Nachweis aus irgend welchen Gründen Interesse hat, aber bei der grossen Verdünnung eine Concentration wünschenswerth erscheinen lässt. Meines Wissens ist auch nach dieser Richtung hin nichts publicirt worden.

Unter den vielen Methoden, welche zum Niederschlagen von Blutfarbstoff aus Lösungen in Wasser verwendet werden können, schaltete ich zunächst gleich von vorn herein alle diejenigen völlig aus, welche den Blutfarbstoff tiefgreifend alteriren; denn es war zu vermuthen, dass dabei sich das CO vom Hämoglobin trennt und gar nicht in den Niederschlag übergeht, oder dass das CO wenigstens im Niederschlag schwer nachweisbar wird. Unter solchen Umständen schien mir am vortheilhaftesten die Fällung des gelösten Blutfarbstoffes durch Schwermetalle, und zwar in Sonderheit die von Kobert[1]) und seinen Schülern[2]) eingeführte, durch Salze des Zinks oder Kupfers. Diese Fällungsmethode ist in den meisten Büchern gar nicht erwähnt. Ich sehe mich veranlasst, sie genauer zu besprechen, da ich sie, wie wir sehen werden, für meine Zwecke mit Erfolg zu verwenden vermochte.

### 1. Versuche mit Zink.

Schüttelt man mit destillirtem Wasser 50—100fach verdünntes Blut bei neutraler Reaction längere Zeit mit Zinkstaub und lässt es dann einige Stunden ruhig stehen, so fällt natürlich der Zinkstaub rasch zu Boden und bildet einen grauen Bodensatz. Darüber aber entsteht, wie

1) R. Kobert, Ueber ein neues Parhämoglobin. Sitzungsberichte der Dorpater Naturforschergesellschaft. Jahrgang 1891. (Nach einem mit Demonstration gehaltenen Vortrage.) — Derselbe, Ueber den Nachweis von Fermenten und Giften im Blute. Vortrag, gehalten in der Section für Pharmacie und Pharmakognosie der 64. Versammlung der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Aerzte in Halle a. S. im September 1891, abgedruckt in den Verhandlungen dieser Versammlungen. S. 177.

2) Grahe, Ueber die Einwirkung des Zinks und seiner Salze auf das Blut und den Blutfarbstoff. Arbeiten des pharmakologischen Instituts zu Dorpat. Herausgegeben von R. Kobert. Bd. IX. S. 155. Stuttgart. 1893. — Klemptner, Zur Wirkung des Kupfers auf den thierischen Organismus. Dissert. Jurjew. 1894.

Kobert fand, noch ein zweiter weit voluminöserer Niederschlag von blutrother Farbe. Darüber bildet sich, falls die Zinkmenge gross genug und das Schütteln lange genug war, eine farblose Wasserschicht.

Eine blutrothe Schicht ist es, welche uns hier interessirt. Sie besteht aus einer lockeren Verbindung von Zink und Hämoglobin, welche nach den Untersuchungen von W. J. Dilling[1]) spectroskopisch sich in jeder Beziehung gerade so wie der Blutfarbstoff verhält. Physikalisch ist diese Substanz jedoch vom Blutfarbstoff principiell dadurch verschieden, dass sie in neutralem Wasser oder genauer in neutralen Salzlösungen ganz unlöslich ist und daher als feiner schlammiger Bodensatz ausfällt.

Statt des unbequemen Schüttelns mit Zinkstaub führte Kobert später den Zusatz von Zinksalzlösungen ein. Er hielt hierüber im Jahre 1891 zwei Vorträge, den einen in der Dorpater Naturforschergesellschaft, den anderen auf der Naturforscherversammlung in Halle, und liess auch noch von seinem Schüler Grahe im Jahre 1893 darüber eine Arbeit veröffentlichen. Nach Kobert und Grahe kann man Lösungen von Blut, Blutkörperchen oder krystallisirtem Hämoglobin durch Zusatz geringer Mengen mehrerer Zinksalze (Zincum sulfuricum, Zincum aceticum, Zincum chloratum, Zincum valerianicum, Zincum salicylicum, Zincum sulfocarbolicum und Zincum tartaricum) in der Weise verändern, dass die Gesammtmenge des Blutfarbstoffes an Zink gebunden, ausfällt und beim Filtriren auf dem Filter bleibt, so dass das Filtrat vom Hämoglobin nichts oder fast nichts enthält. Kobert hat gleich in seinem ersten Vortrage angedeutet, dass es sich vielleicht nur um eine Adsorption des Blutfarbstoffes an ausfallendes Zinkeiweiss handelt. Für unsere Zwecke ist diese Frage aber ohne Belang. Für uns ist nur die Thatsache von Interesse, dass durch die Zinkbehandlung der Blutfarbstoff aus der Lösung mit niedergeschlagen werden kann. Kobert und Grahe bezeichneten damals diese Verbindung des Blutfarbstoffes mit dem Zink in Anlehnung an die Nencki'sche Nomenclatur als ein Parhämoglobin. Mit diesem Namen nämlich hatte Nencki ein in Wasser unlöslich gewordenes Umwandlungsproduct des Blutfarbstoffes benannt. Durch die Bezeichnung Zinkparhämoglobin wurde die Substanz von Kobert und Grahe von dem Nencki'schen Alkoholparhämoglobin unterschieden. Im Sinne anderer Autoren könnte man versucht sein, das Zinkparhämoglobin als ein Zinkkathämoglobin zu bezeichnen. Das echte Kathämoglobin hat jedoch ein ganz anderes Spectrum. Wir wollen daher in Uebereinstimmung mit Kobert und Dilling unsere Substanz jetzt kurz nur als Zinkhämoglobin bezeichnen.

Es muss gleich hier bemerkt werden, dass das Zinkhämoglobin nach Kobert und Grahe nur so lange als es noch feucht ist, in spectraler Hinsicht mit dem Blutfarbstoff übereinstimmt. Nach energischem Trocknen bekommt es ganz andere Eigenschaften, als es in ungetrocknetem Zustande hatte. Und dieses kann nicht Wunder nehmen, denn auch Hämoglobin, man mag es umkrystallisiren, so oft man will, büsst nach dem

1) W. J. Dilling, Erklärung zu den Spectraltafeln der Absorptionsbänder des Blutfarbstoffs. S. 12. Stuttgart. 1911.

Trocknen seine wichtigsten Eigenschaften ein und geht in ganz unberechenbarer Weise in Methämoglobin, Kathämoglobin, ja in Hämatin über.

Das Spectrum des frisch dargestellten und des auf Glasplatten schwach getrockneten Zinkhämoglobins hat, wie schon oben gesagt wurde Dilling genau gemessen und abgebildet; er hat es mit dem des Hämoglobins fast identisch gefunden. Eben dieser Autor[1]) hat gezeigt, dass man daraus prachtvolle Krystalle von Hämochromogen darstellen kann; er hat Abbildungen solcher aus dem Blut verschiedener Thiere veröffentlicht.

Unterwirft man das feuchte Zinkhämoglobin vorsichtig dem Trocknen, so erhält man, falls man nur an der Luft trocknet und die letzten Procente Wasser darin lässt, ein rothes Pulver, welches sich in sehr schwacher Lösung von Alkalien mit der Farbe und dem Spectrum des Oxyhämoglobins löst. Hat man dagegen im Trockenschrank oder im Vacuum bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, so muss man dieselben Umänderungen mit in den Kauf nehmen, welche das krystallisirte Hämoglobin beim Trocknen erleidet, nämlich einen successive vor sich gehenden Zersetzungsprocess durch das Stadium des Methämoglobins hindurch bis zu globulinhaltigem Hämatin, nur dass man in unserem Falle nicht Hämatin, sondern Zinkhämatin erhält. Ein derartiges Präparat ist als Zinkhämol im Handel. Hämol ist ein von Zink möglichst befreites, sonst aber analoges Präparat. Das Zinkhämol ist in verdünnten Alkalien unlöslich. Dass der Hämatincomplex darin steckt, kann durch alle Hämatinreactionen leicht nachgewiesen werden. Es lässt sich ferner sehr leicht in Hämochromogen umwandeln.

Wir werden uns zunächst nur mit dem noch feuchten Zinkhämoglobin zu beschäftigen haben. Von seinen Eigenschaften interessiren uns hier besonders folgende:

1. Das Zinkhämoglobin ist im Gegensatz zum freien Hämoglobin in Wasser nicht löslich, wofern das Wasser eine kleine Menge überschüssigen Zinks und kleine Mengen Neutralsalze enthält. Nach Beseitigung des überschüssigen Zinks von den vom Blut her vorhandenen Salzen geht das Zinkhämoglobin beim energischen Auswaschen auf dem Filter mit sehr viel Wasser langsam wieder in Lösung. Für meine Versuche kommt nur das Stadium in Betracht, wo es in Wasser unlöslich ist.

2. Das Spectrum des in Wasser unlöslichen Zinkhämoglobins ist dem des Oxyhämoglobins, wie schon Grahe fand, zum Verwechseln ähnlich oder, wie Dilling fand, mit ihm fast identisch.

3. Wie das Oxyhämoglobin durch Reductionsmittel umgewandelt wird, so wird auch das Zinkoxyhämoglobin durch Reductionsmittel reducirt. Das dabei entstehende Spectrum des Zinkhämoglobins ist dem des reducirten Hämoglobins gleich.

4. Beide Verbindungen, das O-haltige und das O-freie Zinkhämoglobin, lassen sich aus beliebigen Blutarten darstellen; sie wurden schon von Kobert und Grahe gewonnen aus dem Blute von Mensch, Pferd, Rind, Schwein, Schaf, Hund, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Ente,

---

1) W. J. Dilling, Atlas der Krystallformen und der Absorptionsbänder der Hämochromogene. Stuttgart 1910.

Huhn, Eichhörnchen, Frosch und hämoglobinhaltigen Schnecken. Dilling hat sie auch noch aus anderen Blutarten gewonnen. Um aus dem Blute der genannten Thiere, nachdem dasselbe in Wasser gelöst war, die Stromata zu entfernen, benutzten Kobert und Grahe mit $CO_2$ imprägnirtes destillirtes Wasser. Dieses hat nämlich die Eigenschaft, die Stromatamassen zum Zusammenballen und zum Absetzen zu bringen. Für uns hier ist nur von Interesse zu wissen, dass die Fällung in gleicher Weise durch Zink möglich ist, mögen die Stromata vorhanden sein oder nicht.

5. Das auf dem Filter gesammelte Zinkoxyhämoglobin ist, auch wenn Kochsalz und Zinksalze noch keineswegs völlig ausgewaschen sind, in wässeriger Lösung von kohlensaurem Ammon mit schöner rother Farbe leicht löslich und zeigt die beiden Streifen des Oxyhämoglobins. Es ist auch sehr gut löslich in Wasser, das mit kleinen Mengen gesättigter wässeriger Lösung von Schwefelammon, etwa im Verhältniss 1 zu 200, alkalisch gemacht worden ist. Diese Lösung in sehr verdünntem Schwefelammonium ist eine ganz klare, obwohl Schwefelammon ja eigentlich alle Zinksalze ausfällt. Auch nach Zusatz von etwas mehr, ja von unverdünntem Schwefelammon, tritt keine Fällung ein, wofern kein Ueberschuss von Zink vorhanden ist.

6. Die Analyse des chemisch reinen Zinkhämogobins ergab 1,01 pCt. Zink, wobei als Ausgangsmaterial umkrystallisirtes reines Pferdehämoglobin verwendet wurde.

Es war nun meine Aufgabe festzustellen, ob es auch ein Zinkkohlenoxydhämoglobin giebt und ob man dieses benutzen kann, um aus Kohlenoxydblutlösungen das Kohlenoxydhämoglobin auszufällen und dadurch zu concentriren. In Folgendem möge der Gang meiner Untersuchung mitgetheilt werden. Ich wählte mehrfach ganz altes Blut, um zu prüfen, ob auch solches zur Zinkfällung noch verwendbar ist.

### Versuch I.

Defibrinirtes Kalbsblut, das mindestens eine Woche gestanden hat und schon übel riecht, wird zu 20 ccm mit 80 ccm Aqua destillata gemischt und der Mischung, ohne zu filtriren, 2,5 ccm einer 1proc. $ZnCl_2$-Lösung zugesetzt. Es entsteht ein voluminöser hellrother Niederschlag. Nach mehrstündigem Stehen wird dieser filtrirt. Das Filtrat ist gänzlich farblos. Der auf dem Filter nach 24 Stunden schon ziemlich consistent gewordene Brei wird in schwefelammonhaltigem Wasser, das in 200 ccm Aq. dest. 1 ccm Schwefelammon enthält, leicht gelöst. Die Lösung ist von schöner rother Blutfarbe.

Genau ebenso wird mit einer gleichen Portion des Blutes verfahren, nachdem es mittels Leuchtgas CO-haltig gemacht worden ist. Irgend ein Unterschied in Bezug auf Lösung und Fällung tritt gegenüber dem normalen Blute nicht ein. Nur in der Farbe unterscheiden sich die beiden Lösungen in Schwefelammonwasser; während die CO-haltige Lösung dauernd rein rothe Färbung aufweist, hat die der normalen, CO-freien Lösung nach dem Schütteln einen Stich ins Gelbe.

Nach 36stündigem Stehen der beiden Breiarten werden je gleiche Portionen in 10 ccm schwefelammonhaltigem Wasser gelöst. Beide Lösungen zeigen im Spectrum zwei Streifen zwischen D und E, die sich ohne genaue Wellenlängenbestimmung vor dem Spectralapparate nicht deutlich von einander unterscheiden. Nun werden zu beiden Lösungen je $^1/_2$ ccm unverdünnten Schwefelammons gesetzt und darüber zum Abschlusse der Luft flüssiges Paraffin geschichtet. Schon nach kurzem Stehen im

Wasserbade von 38° zeigt die Lösung des normalen Zinkhämoglobins den dicken Reductionsstreifen des sauerstofffreien Hb, während die CO-haltige Lösung ihr altes zweistreifiges Spectrum unverändert hat und auch nach tagelangem Stehen im Wasserbade beibehält.

### Ergebniss.

In dem Niederschlag, den man aus einer 20proc. Lösung alten Kalbsblutes, das mit CO vergiftet ist, durch Ausfällung mit $ZnCl_2$ gewonnen hat, lässt sich Tage lang CO spectroskopisch nachweisen. Das CO bleibt, so müssen wir schliesen, bei der Ausfällung des gelösten Blutfarbstoffes durch $ZnCl_2$-Lösung an das Hämoglobin gebunden; es entsteht also ein Zinkkohlenoxydhämoglobin.

Versuch II.

Spuren der beiden Breiarten von Versuch I werden im Reagensglase versetzt je mit

1. Aqua destillata
2. Ammonium carbonicum
3. Ammonium chloratum
4. Natrium carbonicum
5. Natrium bicarbonicum

} in wässeriger Lösung,

6. Aqua destillata, das Spuren von Schwefelammon enthält.

Nach 24stündigem Stehen hat sich in den beiden mit 1. bezeichneten Proben je eine rothe Masse am Boden des Glases abgesetzt; in allen anderen Gläsern ist klare Lösung erfolgt. Auch auf Zusatz von unverdünntem Schwefelammon tritt keine Fällung oder Trübung auf, auch nicht nach vielen Stunden, wohl aber die für $O_2Hb$ bezw. COHb charakteristischen spectralen Erscheinungen.

### Ergebniss.

Zink-CO-Hämoglobin ist genau wie normales Zinkhämoglobin unlöslich in Wasser, löslich dagegen in Lösungen von kohlensaurem Ammon, Salmiak, kohlensaurem und doppelkohlensaurem Natrium und in Schwefelammon. Nach dem Aufschütteln bleiben Zink-Hämoglobin und Zink-CO-Hämoglobin zunächst fein suspendirt und verstatten bequemes Spectroskopiren. Schwefelammon wandelt die beiden Suspensionen sofort in klare Lösungen um, vermag also nicht das Zink aus seiner Bindung mit Hämoglobin resp. CO-Hämoglobin auszufällen. Die Spectra beider Lösungen sind nach dem Schütteln mit Luft zweistreifig; nach dem Stehen bei Körpertemperatur und vorheriger Ueberschichtung mit Paraffinöl wird das zweistreifige Spectrum des Zink-Oxyhämoglobins zu dem einstreifigen des reducirten Zinkhämoglobins, während das des Zink-CO-Hämoglobins keine Veränderung zeigt.

Es folgten nun Versuche in der gleichen Weise mit 10- und 20procentigen Lösungen von frischem Kalbsblut, frischem und altem Rinderblut, frischem und altem Pferdeblut, Kaninchenblut, Hundeblut, frischem Menschenblut und dem Blute einer tuberculösen Leiche, und immer wieder konnte ich das CO-Zinkhämoglobin mittels einer $Cl_2Zn$-Lösung ausfällen und in dem entstandenen Brei Tage

lang das CO spectroskopisch nachweisen. Ich möchte aus diesen Versuchen schliessen, dass die Zinkmethode die Ausfällung und den Nachweis des CO in den verschiedenen Blutarten gestattet. Selbst aus ganz verdünnten, z. B. 1proc. Blutlösungen gelang die Ausfällung und der Nachweis der CO-Zinkhämoglobinverbindung.

Ein Versuch dieser Art möge hier mitgetheilt werden:

Versuch III.

Je 100 ccm einer 1proc. Lösung von normalem und von mit CO vergiftetem frischem Rinderblute, denen beiden mittels $CO_2$ nach der oben beschriebenen, von Kobert und Grahe[1]) benutzten Methode die Stromata entzogen worden waren, wurden mit je 5 ccm 1 proc. $Cl_2Zn$-Lösung versetzt. Es entsteht zunächst ein deutlicher Niederschlag, aber am anderen Morgen sind beide Flüssigkeiten gallertig geronnen. Da sie sich aber beim Zerrühren mit einem Glasstab wieder ganz flüssig machen lassen und bei einem Filtrationsversuch unverändert durch das Filter gehen, wird beiden nochmals je 5 ccm $Cl_2Zn$-Lösung zugesetzt. Auch das genügt nicht. Als jedoch nun noch je 5 ccm gesättigte ClNa-Lösung zugesetzt wird, entsteht augenblicklich ein Niederschlag. Dieser lässt sich filtriren und liefert ein gänzlich farbloses Filtrat, in dem keine Nachgerinnung eintritt. Der Brei vom Filter wird jetzt in der üblichen Weise mit schwefelammonhaltigem Wasser versetzt und nach Zusatz einiger Tropfen unverdünnten Schwefelammons und Ueberschichtung mit Paraffin ins Wasserbad von 38° gestellt. Nach kurzem Stehen zeigt die normale Zinkhämoglobinlösung das Spectrum des reducirten Hämoglobins, während das CO-Präparat unverändert noch nach 24 Stunden seine zwei Streifen zwischen D und E vor dem Spectroskop zeigt.

Bei Wiederholung des Versuches wurde gleich nach der ersten Dose Chlorzink Kochsalz zugesetzt und dadurch die Ausfällung wesentlich begünstigt.

## Ergebniss.

Auch aus stark verdünnten, nur 1proc. Blutlösungen, ja aus noch mehr verdünnten lässt sich mit 1proc. Chlorzinklösung, wofern gleichzeitig noch Kochsalz zugesetzt wird, die Gesammtmenge des CO-Hämoglobin ausfällen, und dieser Niederschlag ist in schwefelammonhaltigem Wasser löslich. Man kann in ihm, wenn man ihn zwischen zwei Glasplatten presst, oder wenn man ihn löst, das CO-Hämoglobin spectroskopisch nachweisen. Es ist also mit Hülfe unserer Methode möglich, aus sehr verdünnten Lösungen des Kohlenoxydhämoglobins einen an CO relativ reichen Niederschlag von CO-Zinkhämoglobin herzustellen. Dies ist für den Nachweis des Kohlenoxyds von erheblicher Bedeutung.

Weitere Versuche bezogen sich auf das Verhalten des CO-Zinkhämoglobins zu neutralen Lösungen von Wasserstoffsuperoxyd. Ich hatte gehofft, dass dieser Verbindung die katalytische Wirkung, welche reines Hämoglobin sowie Zinkhämoglobin auf das Wasserstoffsuperoxyd ausüben, mehr oder weniger fehlen würde. Dies ist jedoch nicht der Fall; es verhält sich vielmehr gegen Wasserstoffsuperoxyd gerade so wie reines Hämoglobin.

1) Grahe, Ueber die Einwirkung des Zinks und seiner Salze auf das Blut und den Blutfarbstoff. Arb. des pharmakol. Instituts zu Dorpat. Bd. IX. S. 155.

Alle bisherigen Ergebnisse beziehen sich auf CO-Zinkhämoglobin, das noch im feuchten Zustande ist. Es galt nun zu erforschen, in welcher Weise es sich verändert, wenn man es dem Trocknen unterzieht, und besonders war die Frage von Bedeutung, ob man auch im getrockneten CO-Zinkhämoglobin das CO noch nachweisen kann. Ich stellte zu diesem Zwecke folgende Versuche an:

Versuch IV.

In gewöhnlicher Weise wurden eine Portion normales Rindsblut und eine Portion CO-Rindsblut mit Chlorzink gefällt und auf zwei Filter gebracht. Die Filtrate waren farblos.

Von den auf den Filtern befindlichen Zink- und CO-Zinkhämoglobinniederschlägen werden je kleine Portionen auf Glasplatten gestrichen und diese auf der Platte des Wasserbades getrocknet. Nach 1- bis 6stündigem Stehen werden die getrockneten Massen abgeschabt und in der Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben. Dabei ergiebt sich, dass das CO-haltige Pulver roth bis braunroth aussieht, das CO-freie aber rein braun wie das käufliche Hämol. Von beiden Pulvern werden gleiche Portionen mit gleichen Mengen schwefelammonhaltigen Wassers versetzt. Beide lösen sich beim Schütteln mit rother Farbe und zeigen das Spectrum des Oxyhämoglobins resp. des CO-Hämoglobins. Zusatz von gleichen Mengen unverdünnten Schwefelammons und Stehen im Wasserbad führen das normale Zinkhämoglobin in typisches Hämochromogen über, die CO-haltige Lösung behält ihr zweistreifiges Spectrum unverändert, besteht also entweder aus CO-Hämoglobin oder aus CO-Hämochromogen.

Derselbe Versuch wird wiederholt, nur dass die Glasplatten 9—12 Stunden auf der Platte des Wasserbades liegen bleiben. Auch diesmal resultiren zwei Pulver, die in der Farbe, wenn auch nur wenig, verschieden sind. Nach der Lösung in schwefelammonhaltigem Wasser giebt auch hier das CO-haltige Präparat im Spectrum die beiden typischen CO-Streifen zwischen D und E, die durch Zusatz von unverdünntem Schwefelammon und Stehen im Wasser von 38 $^0$ nicht zum Verschwinden gebracht werden können, während die Lösung des CO-freien Pulvers das Spectrum des Hämochromogens annimmt.

Das gleiche Ergebniss erhielt ich, wenn ich die beiden Breiarten auf Glasplatten in der Sonne oder im Zimmer bei gewöhnlicher Temperatur trocknen liess. So stellte ich mir von allen Blutarten, die ich zu meinen früheren Versuchen verwendet hatte, trockene Pulver von CO-Zinkhämoglobin dar, und konnte in ihnen gleich nach dem Trocknen und auch noch mehrere Wochen lang das CO spectroskopisch nachweisen. Nach Abschluss meiner Arbeit untersuchte ich nochmals die Pulver, die ich vor etwa $^3/_4$ Jahren angefertigt hatte; sie hatten zwar ihre Löslichkeit in schwefelammonhaltigem Wasser beibehalten, CO aber konnte ich in ihnen spectroskopisch jetzt nicht mehr nachweisen, was ich nach so langer Zeit auch nicht erwartet hatte.

**Ergebniss.**

Man kann CO-Zinkhämoglobin auf Glas- oder Thonplatten trocknen und ohne Zersetzung zu einem feinen Pulver verreiben. Je schneller man trocknet, und je niedriger die Temperatur ist, bei der man trocknet, desto günstiger ist das Ergebniss. Die letzten Reste Wasser, welche zurückgehalten werden, bedingen die Haltbarkeit. Aufheben der Präparate im Vacuum über

Chlorcalcium schadet daher. Die noch Spuren von Wasser enthaltenden, in gut verschlossenen, ganz angefüllten Flaschen aufbewahrten Pulver sind in schwefelammonhaltigem Wasser mit schöner rother Farbe löslich. Die Lösung zeigt nach Zusatz von Schwefelammon und Ueberschichtung mit Paraffin unverändert das Spectrum des Kohlenoxydhämoglobins resp. des Kohlenoxydhämochromogens, dessen Spectrum ja mit dem des ersteren identisch ist. Der Nachweis des Kohlenoxyds gelingt in diesen Pulvern noch mehrere Wochen hindurch.

### 2. Versuche mit Kupfer.

Nach diesen Ergebnissen, die ich aus meinen Versuchen mit Zinksalzen erhielt, lag die Frage recht nahe: Wie verhalten sich die Salze des Kupfers, das in chemischer Beziehung dem Zink ja sehr nahe steht, dem Blutfarbstoff und speciell dem Kohlenoxydblutfarbstoff gegenüber? Auch hierbei legte ich eine Arbeit eines Schülers von Professor Kobert zu Grunde. Klemptner[1]) fand, dass auf Zusatz von Kupfersalzen zu verdünnten Blutlösungen eine wolkenartige Trübung von Terracottafarbe eintritt. Nach längerem Stehen setzte sich diese Trübung, die nach Ansicht Klemptner's eine chemische Verbindung des Kupfers mit Hämoglobin, also ein Kupferhämoglobin ist, als dicker, chocoladenfarbener Bodensatz im Reagenzglase ab; er enthält 2 pCt. Cu. Beim Filtriren tropfte ein gänzlich farbloses Filtrat ab. Der Niederschlag war in salzhaltigem Wasser durchaus unlöslich, löste sich dagegen in 0,5 proc. Schwefelammon mit dunkelrother Farbe. Auch liess sich der gewonnene Bodensatz vorsichtig trocknen und zu einem braunen Pulver verreiben. Dieses Pulver liess sich ebenfalls in 0,5 proc. Schwefelammon lösen und zeigte genau, wie die Lösung des noch feuchten Breies, das Spectrum des Oxyhämoglobins. Auch sonst zeigte die Lösung des trockenen Pulvers, abgesehen davon, dass es sich schwerer lösen liess, genau die gleichen Eigenschaften wie der noch feuchte Niederschlagsbrei, z. B. liess es sich in kohlensauren Alkalien und allen organischen Salzen des Ammoniaks bei gehöriger Verdünnung unzersetzt mit schöner rother Farbe und dem Spectrum des Oxyhämoglobins lösen.

Meine Aufgabe bestand wieder darin, Klemptner's Versuche auch auf Kohlenoxydblut auszudehnen und nachzuweisen, worin sich dieses vom normalen Blute unterscheide, und besonders war die Frage von Bedeutung, ob man auch die Fällung mit Kupfersalzen dazu benutzen könnte, aus sehr verdünnten Kohlenoxydblutblösungen das Kohlenoxydhämoglobin niederzuschlagen und in dem Niederschlag Kohlenoxyd zu diagnosticiren.

Aus einer Reihe von Versuchen dieser Art möge folgender Versuch mitgetheilt werden:

Versuch V.

Zu 10 ccm frischen Schweineblutes, das mit 90 ccm Aqua dest. verdünnt ist, werden 10 ccm einer 1proc. Kupfersulfatlösung zugesetzt. Es tritt ein dicker Niederschlag auf.

1) Max Klemptner, Zur Wirkung des Kupfers auf den thierischen Organismus. Diss. Jurjew 1894.

Gleichfalls senkt sich ein dicker Niederschlag zu Boden, wenn man 10 ccm einer 1 proc. Kupfersulfatlösung zu 100 ccm 10 proc. Schweineblutes setzt, das mit Kohlenoxyd gesättigt ist.

Beide Niederschläge zeigen schon frisch einen sehr deutlichen Farbenunterschied. Der aus normalem Blute gewonnene Bodensatz ist von der Farbe der Terracotta, wohingegen der Niederschlag aus dem kohlenoxydhaltigen Blute roth, wenn auch weniger leuchtend roth als die mittels Zinksalzen gewonnenen Niederschläge, aussieht.

Jedoch nach längerem Stehen verschwinden diese Farbenunterschiede und beide Niederschläge nehmen dann eine fast gleiche, chocoladenbraune Farbe an.

Je gleiche Portionen der Niederschläge werden mit $^1/_2$ proc. Schwefelammon übergossen, wobei sie sich leicht lösen. Die Farbe beider Lösungen ist, namentlich falls die beiden Breiarten längere Zeit gestanden haben, eine gelblichbraune; ihr Spectrum zeigt zwei Streifen zwischen D und E. Werden nun zu beiden Lösungen einige Tropfen unverdünnten Schwefelammons zugesetzt und beide mit Paraffin überschichtet, so verschwinden schon nach wenigen Minuten die zweistreifigen Spectra in beiden Gläsern, um dem einfachen Streifen des reducirten Hämoglobins Platz zu machen. Neben diesem Streifen ist meist noch ein Streifen im Roth nachweisbar, der durch seine Lage an den des Methämoglobins im Roth erinnert.

Nach 36stündigem Stehen zeigen beide Lösungen, so lange sie nicht mit Luft geschüttelt werden, besonders im untersten Theile des Reagensglases, das Spectrum des Hämochromogens.

Beide nach obiger Methode gewonnenen Niederschläge lassen sich trocknen und in $^1/_2$ proc. Schwefelammon lösen. Ein Farbenunterschied besteht nicht oder nur ein ganz geringer, und auch spectroskopisch tritt keine auffällige Verschiedenheit ein.

## Ergebniss.

Kupfersulfat in 1 proc. Lösung vermag aus verdünnten Blutlösungen analog den Zinksalzen ebenfalls das Hämoglobin resp. das Kohlenoxydhämoglobin niederzuschlagen. Es besteht Anfangs eine sehr charakteristische Verschiedenheit in der Farbe der beiden Niederschläge, die deutlicher ist als bei der Zinkfällung, eine Reaction, die bereits 1885 der damalige Assistent am pharmakologischen Institute zu Dorpat, Stan. v. Zaleski[1]) angegeben hat. Zur spectroskopischen Diagnose des Kohlenoxydhämoglobins ist dagegen diese Methode nicht geeignet; sie ist lediglich eine makroskopische. v. Zaleski hat nicht erwähnt, dass man auch aus sehr verdünnten, wässrigen Lösungen mittelst Kupfersulfat und Kochsalz minimale Mengen von Kohlenoxydhämoglobin ausfällen und dadurch sichtbar machen kann. Vor der Zinkmethode hat sie den Vorzug, dass das Spectroskop dabei nicht nötig ist.

## Gesammtergebniss.

Nach meinen Versuchen kann man das Kohlenoxyd aus verdünntem Blute mit dem Blutfarbstoff niederschlagen, und zwar, falls die Blutkörperchen noch erhalten sind, durch vegetabilische Agglutinantien, wie Ricin oder Phasin, und, falls die Blutkörperchen nicht mehr erhalten

1) Stanislaus v. Zaleski, Archiv f. experiment. Pathologie u. Pharmakol. Bd. 20. S. 34.

sind, durch Zink- oder Kupfersalze. Der Niederschlag mittels Kupfersalzen zeigt bei normalem Blute eine braune, bei Kohlenoxydblut aber eine charakteristische rothe Farbe. Der durch Fällung mit Zinksalzen aus Kohlenoxydblut gewonnene Niederschlag zeigt einen weniger deutlichen Farbenunterschied gegenüber dem CO-freien Zinkhämoglobin; aber aus dem Zinkniederschlag lässt sich mittels schwefelammonhaltigen Wassers eine rothe Lösung herstellen, welche nicht etwa reducirtes Hämoglobin enthält, sondern das typische Kohlenoxydspectrum liefert.

Das Kohlenoxydzinkhämoglobin lässt sich trocknen und in Pulverform in wohlverschlossenen Gläschen mehrere Wochen lang unzersetzt aufbewahren, wofern man es nicht absolut wasserfrei gemacht oder erhitzt hat.

Eine Fortsetzung dieser Versuche nach verschiedener Richtung hin behält sich unser Institut zunächst noch vor.

# Lebenslauf.

Ich, Bernhard Friedrich Kurt Gestewitz wurde am 19. Februar 1888 zu Falkenberg, Kreis Liebenwerda der Provinz Sachsen, als Sohn des jetzigen technischen Eisenbahn-Obersekretärs Johannes Gestewitz und seiner Ehefrau Clara, geb. Puhlmann, geboren. Ich bin evangelischer Konfession. Meine Schulbildung genoß ich auf dem Herzoglichen Ludwigs-Gymnasium zu Cöthen i. A., dem Königlichen Viktoria-Gymnasium zu Burg b. M. und dem Königlichen Domgymnasium zu Magdeburg, an dem ich Ostern 1906 absolvierte. Vom Sommersemester 1906, in dem ich mein erstes halbes Jahr mit der Waffe im 36. Füsilier-Regiment diente, bis zum Sommersemester 1908 war ich in Halle a. S. immatrikuliert. Am Ende dieses Semesters bestand ich mein Physikum mit „sehr gut". Vom Wintersemester 1908 bis zum Sommersemester 1909 studierte ich in Rostock, im Winter 1909 war ich in München und vom Sommer 1910 bis Sommer 1911 war ich wieder in Rostock immatrikuliert. Am 2. Juni 1911 beendete ich mein medizinisches Staatsexamen.

Rostock, den 3. Juni 1911.

Kurt Gestewitz.